

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18882

研究課題名(和文)細胞外リン脂質代謝と皮膚疾患

研究課題名(英文) Extracellular lipid metabolism and skin diseases

研究代表者

三木 寿美 (Miki, Yoshimi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：00632499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外リン脂質代謝酵素sPLA2のうち、sPLA2-IIIDは3脂肪酸由来の脂質メディエーターを動員して皮膚炎症疾患を改善する一方、抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を増悪したことから、sPLA2-IIIDの免疫抑制作用は病態に応じて改善と増悪の二面的役割を持つことが明らかになった。また、sPLA2-IIA KOマウスは野生型よりも皮膚癌発症率が低下し、この表現型は同居飼育により腸内細菌叢を混在させることで消失した。糞便メタボローム解析ではKOで微生物由来の脂質が変化したことから、sPLA2-IIAは腸内細菌叢の調節作用を介して全身の免疫や代謝系を変容させ、遠隔組織に間接的に影響するものと想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、炎症促進性脂質メディエーター動員酵素としてのPLA2の既成の概念とは異なる脂質代謝酵素の新しい動作原理を提示しており、炎症性疾患の制御および腸内細菌叢の研究領域に新しい概念を導入するものと言える。また、sPLA2-IIAによる腸内細菌とその代謝物の変化を定性的・定量的に捉えたことは、将来的に疾患の発症や予後予測するための新規診断法の開発や当該代謝物を利用した創薬への応用展開が期待される。近年、3脂肪酸や腸内細菌叢の健康への効果が広く認識されつつあり、本研究成果は疾患の制御や予防において身近な概念として普及することが見込まれる。

研究成果の概要(英文)：sPLA2-IIID resolves the harmful immune responses by controlling the levels of anti-inflammatory 3 lipids. However, Pla2g2d^{-/-} mice showed a marked attenuation of skin carcinogenesis. These results underscore a general role of sPLA2-IIID as an immunosuppressive sPLA2 that allows the microenvironmental lipid balance toward an anti-inflammatory state, exerting beneficial or detrimental impact depending upon distinct pathophysiological contexts in inflammation and cancer.

While, sPLA2-IIA has been implicated in exacerbation of inflammation by producing lipid mediators and protection against infection by degrading bacterial membranes. We found that sPLA2-IIA deficiency ameliorated skin cancer. Metabolome analyses revealed that sPLA2-IIA affects intestinal microbiota. Thus, our results provide a new aspect of sPLA2-IIA as a regulator of intestinal commensal microbiota, and suggest that perturbation of this process is eventually associated with alterations of host responses in distal organs.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ホスホリパーゼA2 脂質 皮膚疾患 癌 免疫 腸内細菌叢 メタボローム リポクオリティ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織恒常性の破綻は様々な病態に関与し、脂質はその制御に密接に関わる重要な分子である。リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、脂質メディエーター産生や生体膜脂質の再構成などの機能を介して生体の恒常性の維持や様々な病態に関わっており、これまでに我々は、従来機能未知であった sPLA₂ 分子種 sPLA₂-IID および sPLA₂-IIF の発現と機能を解明するとともに、最も古くに同定された分子種 sPLA₂-IIA に関する以下の新たな知見を得た。

- (1) sPLA₂-IID はリンパ節樹状細胞に発現しており、遺伝子欠損 (KO) マウスではアレルギー性皮膚炎や乾癬が増悪し、抗ウイルス免疫の活性化により肺炎が改善 (共同研究) することを見出した。このことから、sPLA₂-IID は抗炎症性脂質メディエーターを動員することで Th1/Th17 免疫応答を抑制する “resolving sPLA₂” であることを提唱した。
- (2) sPLA₂-IIF は表皮角化細胞に発現しており、リゾリン脂質の一種 P-LPE を産生して表皮角化細胞の増殖分化を制御することで皮膚の恒常性を調節する一方で、その量的増加は表皮肥厚疾患を促進する。KO マウスでは乾癬・接触性皮膚炎・皮膚癌における表皮肥厚がいずれも改善したことから、sPLA₂-IIF は P-LPE を動員して表皮の恒常性維持と病態に関わる “epidermal sPLA₂” であることを提唱した。さらに、sPLA₂-IIE と sPLA₂-III が表皮の恒常性と疾患に関わる可能性を新たに見出した。
- (3) sPLA₂-IIA は炎症に関わる “inflammatory sPLA₂” として、また、細菌膜を分解する “bactericidal sPLA₂” として知られてきたが、マウスにおける本酵素の発現は腸管に局限している。我々は新たに、KO マウスにおいて皮膚炎や皮膚癌が増悪することを見出し、この結果から、sPLA₂-IIA は腸管局所の何らかの変容を介して皮膚を含めた全身の免疫応答の制御に間接的に関わる可能性が想定された。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの予備的知見を基盤に皮膚疾患における各 sPLA₂ の機能を解明することを目的とした。具体的には皮膚疾患モデルとして 接触性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、乾癬、皮膚癌の各モデルを適用し、(1) 樹状細胞の sPLA₂-IID による免疫抑制の普遍性の検証、(2) 表皮細胞の sPLA₂ 群 (sPLA₂-IIF, IIE, III) の表皮恒常性と疾患における機能的役割分担の確立、(3) 腸管の sPLA₂-IIA による腸管免疫または腸内細菌叢の変容に基づく遠隔皮膚制御の基盤構築、の観点から各遺伝子改変マウスの表現型を精査するとともに、リポミクスで責任脂質代謝産物の同定を試みた。

3. 研究の方法

皮膚免疫疾患のモデル (接触性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、乾癬) を、(a) 全身性 sPLA₂ KO および過剰発現 (TG) マウス、(b) 各 sPLA₂ 発現細胞特異的 KO および TG マウス、(c) 全身性 KO および TG マウスより調製した各 sPLA₂ 発現細胞を移植再構成したマウスにそれぞれ適用し、①～③のモデル系は以下のストラテジーで行うこととした。

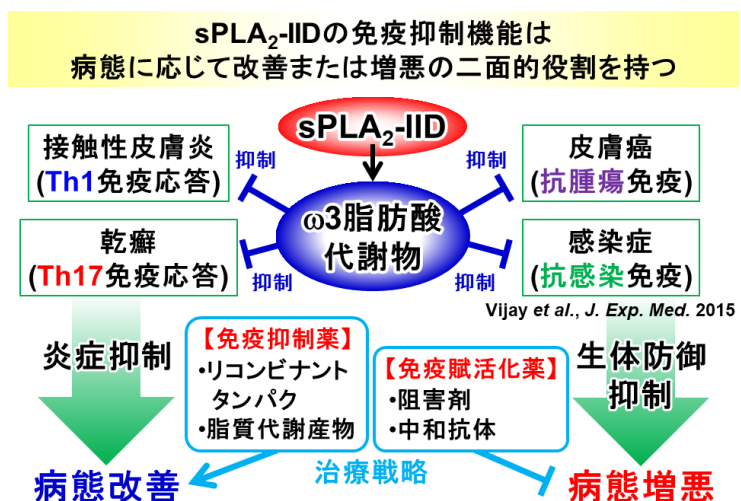
接触性皮膚炎：マウス皮膚にハプテン抗原 (DNFB) を反復塗布する。IFN- γ 誘導を Th1 応答の指標とする。アレルギー性皮膚炎：マウス皮膚に卵白アルブミン (OVA) を反復投与する。OVA 特異的 IgE と IL-4 の誘導を Th2 応答の指標とする。乾癬：マウス皮膚にイミキモドを反復塗布する。IL-17A, IL-22 誘導を Th17 応答の指標とする。

各モデルについて、皮膚の病理所見を精査するとともに、Th1 (), Th2 (), Th17 () の各免疫応答をサイトカインの発現 (定量的 PCR, ELISA) や免疫細胞の誘導・活性化 (FACS) により評価する。リポミクスにより皮膚および所属リンパ節の脂質プロファイリングを行うことで、各 sPLA₂ の標的基質と代謝産物候補を絞り込む。さらに、それぞれの系を反映する初代培養系を用いて各 sPLA₂ やその代謝物の効果を検討し、責任代謝産物を同定する。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞の sPLA₂-IID による免疫抑制の普遍性

これまでの研究を通じて、リンパ節の樹状細胞に発現している sPLA₂-IID は 3 脂肪酸由来の抗炎症性脂質メディエーターを動員して接触性皮膚炎 (Th1) や乾癬 (Th17) を抑制する “resolving sPLA₂” として機能する一方、抗感染免疫を抑制することでウイルス性肺炎を増悪させることが明らかとなっている。本研究では、KO マウスにおける皮膚癌モデルの軽減について、そのメカニズムを解析した。その結果、KO



【図1】sPLA₂-IIDによる免疫抑制機能の二面的役割

マウスでは野生型 (WT) マウスと比較して免疫バランスが Th1 応答優位な状態に傾いており、癌抑制性の M1 マクロファージおよび細胞障害性 T 細胞が増加するとともに、癌促進性の M2 マクロファージが減少することが分かった。また、リンパ節のリピドミクス解析の結果、6 脂肪酸であるアラキドン酸 (AA) 代謝物は WT と KO の間で有意な差が無いのに対し、7(S)-Maresin 1 や Resolvin D2 などの 3 脂肪酸代謝物は KO で定常状態から減少していることが示された。すなわち、3 脂肪酸が M2 マクロファージ誘導活性を持つ過去の報告を踏まえ、sPLA₂-IID はリンパ節中の 3 脂肪酸の構成的な供給を介して癌免疫を抑制し、皮膚癌を促進する役割を持つことが明らかとなった。

近年、癌免疫の賦活化が強力な癌治療薬として注目を集めている。sPLA₂-IID もしくは内因性の 3 脂肪酸の動員を阻害する戦略は、免疫チェックポイントの概念に基づく新しい癌治療法を提唱するものである (図 1)。

(2) 腸管の sPLA₂-IIA による腸管変容と皮膚疾患の関連

sPLA₂-IIA は一般に、炎症部位に誘導されて炎症を増悪する “inflammatory sPLA₂” として知られているが、マウスでは sPLA₂-IIA の発現は腸管 (小腸パネート細胞 > 大腸上皮) に限局しているか (BALB/c 系統)、フレームシフト変異により全く発現していない (C57BL/6 系統)。実際、sPLA₂-IIA はマウスの系統によらず皮膚にはほとんど検出されなかった。このような発現分布にも関わらず、BALB/c 系統の sPLA₂-IIA KO マウスに皮膚癌モデルを適用すると、WT マウスと比較して腫瘍発症率が大幅に低下することを見出した。このことは、腸管に限局発現している sPLA₂-IIA が何らかのメカニズムを介して皮膚病態に影響を及ぼしていることを示唆している。

近年、腸内細菌叢の変化が全身の免疫系や代謝に影響を及ぼすことが注目されている。sPLA₂-IIA は細菌膜のリン脂質を分解する活性が非常に強く、抗菌作用を持つことが知られている。また、sPLA₂-IIA が高発現している小腸パネート細胞は、様々な抗菌ペプチドを分泌して腸内細菌叢を整え、腸管の恒常性の維持に関わるとされる。そこで、sPLA₂-IIA が “bactericidal sPLA₂” として腸内細菌叢に影響を与えている可能性を想定し、通常飼育下の KO マウスの腸内細菌叢を WT と比較解析した。その結果、細菌種の多様性は WT マウスと同様であったが、属レベルのクラスタリング解析で明らかな変化が認められた。さらに、WT と KO を同居飼育 (co-housing) すると、双方の腸内細菌叢が混在パターンを示し、皮膚癌モデルの表現型が消失した。これらの結果は、KO マウスの皮膚癌の表現型が腸内細菌叢の変容に起因することを強く示唆している。また、KO マウスの糞便のリピドミクス解析を行った結果、プロスタグランジン類をはじめとする脂質メディエーター類は WT マウスと差が見られなかったが、微生物に由来するとユニークな脂質代謝物が大きく変動していた。以上より、sPLA₂-IIA は bactericidal sPLA₂ として細菌膜を基質として腸内細菌叢を調節しており、これに起因する全身の免疫系や代謝の変容が間接的に遠隔組織 (皮膚) での腫瘍形成に二次的に影響を及ぼしているものと想定された (図 2)。

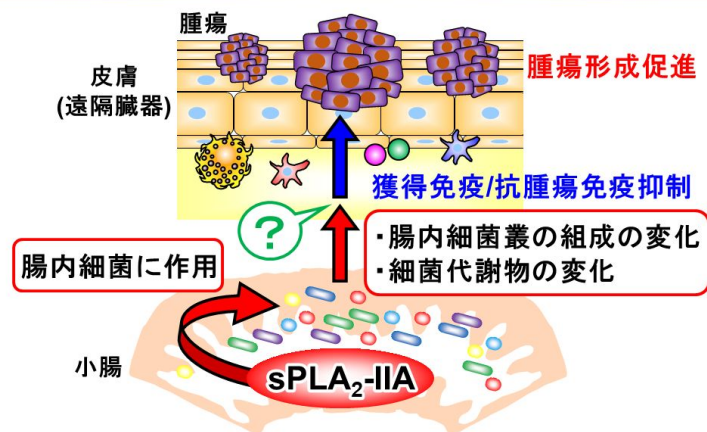
本研究を通じて、sPLA₂ の新しい機能が明らかとなった。特に、sPLA₂-IIA による腸内細菌叢の調節は当該研究領域において新しい概念であり、これを発展させることで疾患の新しい創薬に発展する可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Murakami M, Miki Y, Sato H, Murase R, Taketomi Y, Yamamoto K. (2019) Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A₂s., *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.*, 1864, 803-818. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.08.014. 査読有. (Review)
2. Tsukayama I, Toda K, Takeda Y, Mega T, Tanaka M, Kawakami Y, Takahashi Y, Kimoto M, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. (2018) Preventive effect of *Dioscorea japonica* on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E₂ synthetic pathway., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 62, 139-147. doi: 10.3164/jcbn.17-54. 査読有.
3. Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Nishito Y, Saito M, Fukami K, Yamamoto K, Murakami

【仮説】sPLA₂-IIA は腸内細菌叢を制御し 遠隔臓器に影響を及ぼす



【図2】sPLA₂-IIAによる腸内細菌叢変容を介した全身免疫の制御(仮説)

- M. (2017) Group III phospholipase A₂ promotes colitis and colorectal cancer., *Sci. Rep.*, 7, 12261. doi: 10.1038/s41598-017-12434-z. 査読有.
4. Irie A, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M. (2017) Phosphatidylethanolamine dynamics are required for osteoclast fusion., *Sci. Rep.*, 7, 46715. doi: 10.1038/srep46715. 査読有.
 5. Yamamoto K, Miki Y, Sato H, Nishito Y, Gelb MH, Taketomi Y, Murakami M. (2016) Expression and function of group IIE phospholipase A₂ in mouse skin., *J. Biol. Chem.*, 291, 15602-15613. doi: 10.1074/jbc.M116.734657. 査読有.
 6. Miki Y, Kidoguchi Y, Sato M, Taketomi Y, Taya C, Muramatsu K, Gelb MH, Yamamoto K, Murakami M. (2016) Dual roles of group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer., *J. Biol. Chem.*, 291, 15588-15601. doi: 10.1074/jbc.M116.734624. 査読有.
 7. Murakami M, Yamamoto K, Miki Y, Murase R, Sato H, Taketomi Y. (2016) The roles of the secreted phospholipase A₂ gene family in immunology., *Adv. Immunol.*, 132, 91-134. doi: 10.1016/bs.ai.2016.05.001. 査読有.
 8. 村上 誠, 三木 寿美, 山本 圭, 武富 芳隆. (2016) 分泌性ホスホリパーゼ A₂ とアレルギー疾患., *臨床免疫・アレルギー科.*, 65, 563-568. 査読有.

[学会発表](計 21 件)

1. 三木 寿美, 武富 芳隆, 山本 圭, 細見 晃司, 國澤 純, Siddabasave Gowda B. Gowda, 有田 誠, 村上 誠. IIA 型ホスホリパーゼ A₂ は腸内細菌叢を制御する. **第 91 回日本生化学会大会**, 2018.
2. Nagasaki Y, Kawai E, Tanaka M, Toda K, Tsukayama I, Kawakami Y, Takahashi Y, Kimoto M, Okazaki Y, Miki Y, Yamamoto K, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a potential biomarker of bovine mastitis. **59th International Conference on the Bioscience of Lipids**, 2018 (coauthor).
3. 三木 寿美, 山本 圭, 佐藤 弘泰, 武富 芳隆, 村上 誠. sPLA₂ 分子群による皮膚疾患の制御. **文部科学省新学術領域研究「脂質クオリティが解き明かす生命現象」第 4 回領域会議**, 2018.
4. 三木 寿美. sPLA₂ 分子群による皮膚疾患の制御. **公益財団法人小野医学研究財団第 29 回研究成果発表会**, 2018.
5. 武富 芳隆, 佐藤 弘泰, 宮崎 拓郎, 三木 寿美, 山崎 文義, 瀬藤 光利, 村上 誠. III 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は動脈硬化の新規増悪因子である. **第 60 回日本脂質生化学会**, 2018 (共著).
6. 佐藤 弘泰, 武富 芳隆, 三木 寿美, 村上 誠. 白色脂肪細胞のベージュ化に関わる Thermogenic sPLA₂ の同定. **第 60 回日本脂質生化学会**, 2018 (共著).
7. Miki Y, Taketomi Y, Yamamoto K, Murakami M. Dual roles of group IID phospholipase A₂ in inflammation and cancer. **15th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases**, 2017.
8. Murase R, Taketomi Y, Miki Y, Murakami M. Group III phospholipase A₂ is a novel promoting factor of colorectal diseases. **15th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases**, 2017 (coauthor).
9. Yamamoto K, Fujino S, Miki Y, Murakami M. An epidermal sPLA₂ (PLA2G2F)/ plasmalogen-lysophosphatidylethanolamine axis is a novel drug target for epidermal-hyperplastic diseases. **15th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases**, 2017 (coauthor).
10. 三木 寿美, 山本 圭, 佐藤 弘泰, 村瀬 礼美, 武富 芳隆, 村上 誠. リピドミクスを応用した組織固有の sPLA₂ 依存的脂質代謝経路の探索. **第 42 回日本医用マススペクトル学会年会**, 2017.
11. 山本 圭, 藤野 翔多, 三木 寿美, 村上 誠. LC-MS/MS を用いた表皮肥厚性疾患を制御する新規生理活性脂質の同定. **第 42 回日本医用マススペクトル学会年会**, 2017 (共著).
12. 村瀬 礼美, 武富 芳隆, 齋藤 萌, 三木 寿美, 佐藤 弘泰, 深見 希代子, 村上 誠. III 型ホスホリパーゼ A₂ は大腸疾患の促進因子である. **第 59 回日本脂質生化学会**, 2017 (共著).
13. 入江 敦, 山本 圭, 三木 寿美, 武富 芳隆, 村上 誠. 破骨細胞における膜リン脂質の代謝動態: PE の合成・輸送・分解と膜融合. **第 59 回日本脂質生化学会**, 2017 (共著).
14. Yamamoto K, Miki Y, Taketomi Y, Murakami M. Plasmalogen lysophosphatidylethanolamine is a novel regulator and biomarker for epidermal-hyperplastic diseases. **The 1st International Plasmalogen Symposium**, 2016 (coauthor).
15. 三木 寿美, 城戸口 優, 山本 圭, 村上 誠. IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は皮膚免疫疾患を普遍的に抑制する. **第 89 回日本生化学会**, 2016.
16. 城戸口 優, 山本 圭, 三木 寿美, 村上 誠. IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ は抗腫瘍免疫を抑制する. **第 89 回日本生化学会**, 2016 (共著).
17. 佐藤 弘泰, 牛田 絢子, 武富 芳隆, 三木 寿美, 村上 誠. IID 型分泌性ホスホリパーゼ A₂ はメタボリックシンドロームの新規抑制因子である. **第 89 回日本生化学会**, 2016 (共

- 著).
18. 三木 寿美, 城戸口 優, 山本 圭, 村上 誠. 炎症および癌病態における IID 型 sPLA₂ の二面的役割. **第 58 回日本脂質生化学会**, 2016.
 19. 山本 圭, 三木 寿美, 佐藤 弘泰, 武富 芳隆, 村上 誠. 皮膚の恒常性と病態における二種の sPLA₂ の発現と機能. **第 58 回日本脂質生化学会**, 2016 (共著).
 20. 武富 芳隆, 砂川 アンナ, 入江 敦, 山本 圭, 三木 寿美, 佐藤 弘泰, 小林 哲幸, 村上 誠. マスト細胞を制御する第二の Anaphylactic sPLA₂ の同定. **第 58 回日本脂質生化学会**, 2016 (共著).
 21. Yamamoto K, Miki Y, Sato H, Taketomi Y, Lambeau G, Gelb MH, Murakami M. The two secreted phospholipase A₂s PLA₂G2F and PLA₂G2E play distinct roles in skin homeostasis and diseases. *The 7th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators*, 2016 (coauthor).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院 医学研究科 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門 (村上研究室) ホームページ

<https://lmmhs.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。